

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000118

International filing date: 19 January 2005 (19.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR  
Number: 0406538  
Filing date: 17 June 2004 (17.06.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 25 April 2005 (25.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 01 AVR. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

CHIFFRE PAYS

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

CRÉE PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951

1<sup>er</sup> dépôt

26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

☎ 08 85 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

17 JUIN 2004 à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE 69 INPI LYON

LIEU

0406538

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

17 JUIN 2004

Vos références pour ce dossier  
(facultatif) CAPRIS PRIINT

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*04

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 © W / 030103

<b>17 JUIN 2004</b> REMISE DES PIÈCES DATE 69 INPI LYON LIEU 0406538 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 17 JUIN 2004		<b>2</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE bioMérieux A l'attention de Mme Valérie BITAUD Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE	
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>3</b> NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date _____ <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> N° _____ Date _____ Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> <input type="checkbox"/> N° _____ Date _____		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
<b>4</b> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de détection de la PrP utilisant une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et un ligand autre qu'un ligand protéique			
<b>5</b> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date [2 0 0 1   2 0 0 4] N° FR04/00492 Pays ou organisation Date _____ N° _____ Pays ou organisation Date _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>6</b> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique			
Nom ou dénomination sociale		bioMérieux	
Prénoms			
Forme juridique		S.A.	
N° SIREN		[6 7 3 1 6   2 0 1 3 9 9]	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	Chemin de l'Orme	
	Code postal et ville	[6 9 1 2   8 1 0] MARCY L'ETOILE	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		04.78.87.53.28 N° de télécopie (facultatif) 04.78.87.21.16	
Adresse électronique (facultatif)		cathierine.duret@eu.biomerieux.com	
		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

BR2

17 JUIN 2006  
REMISE DES PIÈCES  
DATE 69 INPI LYON  
LIEU 0406538  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 191203

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>			
Nom	BITAUD		
Prénom	Valérie		
Cabinet ou Société	bioMérieux		
Nationalité	Française		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	PG10872		
Adresse	Rue	Chemin de l'Orme	
	Code postal et ville	[6 9 12 18 10] MARCY L'ETOILE	
	Pays		
N° de téléphone (facultatif)	04.78.87.23.19		
N° de télécopie (facultatif)	04.78.87.21.16		
Adresse électronique (facultatif)	valerie.bitaud@eu.biomerieux.com		
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Choix à faire obligatoirement au dépôt (cf. Notice explicative Rubrique 8)	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		2	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Valérie BITAUD PG 10872 Ingénieur Brevets 		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	



## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*04

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../2...

BR/SUITE

17 JUIN 2004

REMISE DES PIÈCES  
DATE 69 INPI LYON  
LIEU 0406538  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 829 00 71/210103

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		<b>CAPRIS PRIOINT</b>	
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date 2 0 0 1   2 0 0 4 N° FR04/00492 Pays ou organisation Date _____ N° _____ Pays ou organisation Date _____ N° _____	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments - AFSSA -	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	27-31 avenue du Général Leclerc	
	Code postal et ville	9 1 4 7   0 1 1 MAISONS-ALFORT	
	Pays	FRANCE	
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>6 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS -	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	3 rue Michel-Ange	
	Code postal et ville	7 5 7   9 1 4 PARIS CEDEX 16	
	Pays	FRANCE	
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>7 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		Valérie BITAUD PG 10872 Ingénieur Brevets 	
		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE</b> <b>DE L'INPI</b> 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI


**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*04

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Page suite N° 2.../2...

**BR/SUITE**

17 JUIN 2004  
 REMISE DES PIÈCES  
 DATE 69 INPI LYON  
 LIEU  
 N° D'ENREGISTREMENT  
 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0406538

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 829 01 W / 210103

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		<b>CAPRIS PRIORIT</b>	
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date 21/01/2014 N° FR04/00492 Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N°	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		Université Claude Bernard Lyon	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	43 boulevard du 11 novembre 1918	
	Code postal et ville	69622 VILLEURBANNE CEDEX	
	Pays	FRANCE	
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville		
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> M. FIEZ	
Valérie BITAUD PG 10872 Ingénieur Brevets			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
 Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

La présente invention concerne le domaine des maladies à prion, et en particulier un procédé de détection des formes du prion liées à ces maladies.

La protéine prion native ou normale, désignée PrP<sup>c</sup> pour la protéine prion cellulaire, est une glycoprotéine largement exprimée dans les cellules lymphoïdes et  
5 neuronales des mammifères.

Des changements conformationnels de PrP<sup>c</sup> conduisent à l'apparition et à la propagation de la protéine pathologique PrP<sup>sc</sup> qui est résistante à la protéinase K. Cette protéine pathologique sera appelée dans la présente demande indifféremment PrP<sup>sc</sup> ou PrP<sup>res</sup>. Le terme PrP désignera dans la présente demande toute forme de PrP normale ou  
10 non, résistante ou non.

L'accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans les organes des mammifères est à l'origine de nombreuses maladies, appelées maladies à prions ou encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), et notamment de la tremblante des petits ruminants, de la maladie cachectisante chronique (ou chronic wasting disease « CWD ») de l'élan et de  
15 l'antilope, de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), et de la maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ) chez l'homme.

Le développement de la maladie chez l'hôte infecté se traduit par une accumulation de la protéine pathologique PrP<sup>sc</sup> dans le cerveau, ce qui conduit à une altération irréversible des cellules du cerveau.

20 L'apparition tardive après une période d'incubation de 2 à 6 ans et le lent développement des symptômes chez le bétail infecté par l'ESB a considérablement ralenti le développement de modèles épidémiologiques. L'ESB est transmissible par ingestion à l'homme et a conduit à l'apparition d'une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) chez l'homme.

25 La détection de la protéine pathologique PrP<sup>sc</sup> est difficile chez les animaux infectés asymptomatiques avant le développement de la maladie et surtout dans les liquides physiologiques, tels que le sang et l'urine, chez les animaux malades. Il est à présent établi que la PrP<sup>sc</sup> présente chez les animaux destinés à l'alimentation humaine se transmet à l'homme lors de l'ingestion des tissus infectés. Un objectif majeur de  
30 santé publique est donc d'éviter cette transmission en détectant la présence de la PrP<sup>sc</sup> :  
- chez des animaux destinés à la consommation humaine en vue de les retirer de la

chaîne alimentaire,

- dans les dons de sang et dérivés sanguins destinés à la transfusion chez l'homme. En effet, comme le montre une présence de protéine pathogène PrP<sup>sc</sup> dans le sang et les cellules lymphoïdes bien avant l'atteinte cérébrale, et donc bien avant la possibilité de 5 déceler des signes neurologiques évocateurs de maladie à prions cliniquement déclarée, la physiopathologie chez l'homme est méconnue. Ne pouvant réaliser des infections expérimentales comme chez le mouton, l'absence de test de détection dans le sang ou d'autres fluides biologiques ne permet pas de l'étudier et donc de prévenir une transmission interhumaine par don de sang, ou d'envisager un traitement des personnes 10 infectées avant que les lésions cérébrales n'aient débuté ;
- dans les troupeaux animaux avant le stade neurologique, permettant ainsi d'éliminer les animaux infectés précocement, avant arrivée aux abattoirs.

La détection de la présence de PrP<sup>sc</sup> dans des échantillons biologiques chez l'homme ou chez des animaux devient donc d'une extrême importance et plusieurs 15 équipes de chercheurs développent des méthodes de détections immunologiques (WO02/086511). Par ailleurs, des méthodes pour complexer à la PrP<sup>sc</sup> des peptides, des petites molécules ou des inhibiteurs en vue du traitement de vMCJ font l'objet de recherches actives. Toutefois, les méthodes de l'état de la technique se heurtent sans arrêt à la difficulté d'identifier la PrP<sup>sc</sup> de manière fiable lorsqu'elle est en faible 20 quantité dans un échantillon biologique.

Les présents inventeurs ont maintenant mis en évidence contre toute attente que l'utilisation d'une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et d'un ligand autre qu'un ligand protéique dans un test pour le diagnostic de la PrP dans un échantillon biologique susceptible de contenir une telle 25 protéine, permettait la détection de cette protéine à des dilutions et dans des conditions où elle n'est pas détectable avec les méthodes utilisées actuellement, l'utilisation de ces deux composants en combinaison ne modifiant pas la capacité de liaison de la PrP à un partenaire de liaison spécifique de la PrP utilisé dans le test diagnostic.

Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé de détection de la PrP, 30 notamment PrP<sup>sc</sup>, dans un échantillon biologique d'origine humaine ou animale susceptible de contenir de la PrP, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une molécule



ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et un ligand autre qu'un ligand protéique.

Elle concerne également les kits de diagnostic pour la détection de la PrP, comprenant un ligand autre qu'un ligand protéique et une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique.

Par ligand autre qu'un ligand protéique, on entend un composé capable de se lier à la PrP et de nature non protéique. A titre de ligand protéique exclu de cette définition de ligand, on peut citer les anticorps anti-PrP.

Par molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique on entend une molécule ayant au moins une charge positive ou une molécule ayant une fonction engagée dans une liaison osidique, ou bien les deux.

Le procédé de l'invention a donc pour avantage de permettre la détection de la PrP dans des échantillons biologiques où elle est présente en faible quantité grâce à l'utilisation combinée d'une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et d'un ligand autre qu'un ligand protéique tel que défini ci-dessus.

Les échantillons biologiques dans lesquels le procédé de détection de l'invention est mis en œuvre sont tout échantillon d'origine animale ou humaine susceptible de contenir de la PrP.

A titre d'exemple de tels échantillons, on peut citer le cerveau, les tissus du système nerveux central, les organes tels que la rate et l'intestin, ainsi que les fluides biologiques tels que le liquide céphalo-rachidien, l'urine et le sang.

Les animaux qui peuvent être concernés par le procédé de l'invention sont les animaux qui développent les maladies à prion. On citera à titre d'exemple non limitatif les ovins et les bovins.

A titre de charge positive contenue dans les molécules ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, on préfère les charges positives apportées par des fonctions basiques, telles que des fonctions guanidinium ou ammonium.

A titre de liaison osidique contenue dans les molécules ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, on préfère les liaisons de type

hétéroside telles que celles retrouvées dans les macrolides et les aminoglycosides.

Les molécules ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique préférées aux fins de l'invention sont les molécules ayant à la fois au moins une charge positive et au moins une liaison osidique, ainsi que les molécules ayant au moins deux fonctions guanidinium et/ou ammonium, de préférence dans un système moléculaire hydrophile non polymérique.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les molécules ayant au moins une charge positive et au moins une liaison osidique sont choisies parmi les aminoglycosides à noyau guanidinium, la streptomycine étant particulièrement préférée.

Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, les molécules ayant au moins deux fonctions guanidinium et/ou ammonium sont choisies parmi la polyallylamine, le triéthylènetétraamine (TET), la bis-3-aminopropylamine, le tétrachlorhydrate de spermine, le sesquisulfate de dihydrostreptomycine, la streptomycine, ces deux derniers composés appartenant également à la famille des molécules ayant au moins une charge positive et au moins une liaison osidique.

L'utilisation d'une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, en particulier d'une molécule ayant au moins deux fonctions guanidinium et/ou ammonium, de préférence la streptomycine, de préférence encore sous forme de sel, permet la précipitation de la PrP présente dans l'échantillon biologique testé. Cette propriété de précipitation est accrue en présence de la PrP<sup>sc</sup>, en particulier après traitement à la protéinase K (PrP<sup>res</sup>). Cette précipitation est due à la formation d'agrégats de PrP (également appelés PrP réticulée par la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique) obtenus après traitement par la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique.

Ainsi, il est possible de détecter de la PrP, en particulier de la PrP<sup>sc</sup>, par un procédé caractérisé par le fait que l'on met en présence un échantillon biologique issu ou obtenu d'un organisme animal ou humain avec une molécule ayant au moins deux fonctions guanidinium et/ou ammonium, à l'exception des antibiotiques répondant à cette définition, telle que la streptomycine.

Ce procédé peut être mis en œuvre par les étapes consistant à :

a) ajouter, à l'échantillon biologique issu ou obtenu d'un organisme animal ou

humain, une molécule ayant au moins deux fonctions guanidinium et/ou ammonium, à l'exception des antibiotiques,

b) soumettre la solution à un chauffage (par exemple entre 37 et 150°C), puis à une centrifugation et séparer le culot du surnageant,

5 c) détecter la PrP<sup>sc</sup> après migration sur un gel d'électrophorèse, transfert et immunodétection ou après capture sur support solide suivie d'une immunodétection de type ELISA.

Le procédé peut également comprendre comme étape supplémentaire une étape de dénaturation dans les conditions indiquées ci-après.

10 Le procédé peut également comprendre comme étape supplémentaire, de préférence précédant l'étape a), une étape d'addition de protéinase K dans les conditions indiquées ci-après.

De même l'étape de détection de la PrP<sup>sc</sup> peut être mise en œuvre dans les conditions indiquées ci-après.

15 Du fait de leur capacité à se lier à la PrP<sup>sc</sup>, les molécules ayant au moins deux fonctions guanidinium et/ou ammonium, à l'exception des antibiotiques, sont particulièrement utiles pour la précipitation, la détection et/ou le diagnostic de la PrP<sup>sc</sup> même lors de la détection en immunohistochimie, ainsi que pour l'élimination de la PrP<sup>sc</sup> d'un tissu ou d'un fluide biologique.

20 L'ajout d'un ligand autre qu'un ligand protéique permet, à la différence des ligands protéiques, d'amplifier la sensibilité de détection de la protéine PrP et de mieux capturer la PrP réticulée par la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique. De ce fait, la PrP peut être détectée dans des échantillons biologiques où elle n'est présente qu'en de faibles quantités.

25 La quantité de molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, ainsi que du ligand autre qu'un ligand protéique, peut être facilement déterminée par l'homme du métier en fonction des spécificités de l'échantillon. Ainsi, par exemple, la quantité de molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, telle que la streptomycine, peut être comprise entre 50 et  
30 500 mg/ml, de préférence entre 100 et 300 mg/ml.

Contre toute attente, l'action d'une molécule ayant au moins une charge positive

et/ou au moins une liaison osidique sur la PrP, puis la complexation du ligand autre qu'un ligand protéique à l'agrégat de PrP ainsi formé et vice-versa, ne gêne en rien la détection de la PrP, par exemple à l'aide d'un anticorps de détection anti-PrP.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique est ajoutée audit échantillon biologique pour la précipitation de la PrP avant l'ajout du ligand autre qu'un ligand protéique.

De préférence, pour favoriser la précipitation de la PrP, après ajout de la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, on procède à un chauffage du milieu réactionnel à une température comprise entre 25 et 45°C, une température de 37°C étant préférée.

Avant mise en contact de l'échantillon biologique à tester avec ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, l'échantillon peut être préalablement traité avec de la protéinase K pour permettre la digestion protéolytique de la PrP cellulaire. L'échantillon ainsi traité ne contient plus, comme protéine prion, que la protéine PrP<sup>sc</sup> résistante (PrP<sup>res</sup>). L'étape de traitement à la protéinase K est une étape discriminante pour la détermination des maladies à prions ou de la contamination par la PrP<sup>sc</sup> des échantillons testés en l'absence d'anticorps ou ligand spécifique de la PrP<sup>sc</sup> ou de la PrP<sup>res</sup>.

La quantité de protéinase K à utiliser dans le procédé de l'invention peut être facilement déterminée par l'homme du métier. Ainsi, par exemple, elle peut être comprise entre 80 et 160 µg/ml.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, le procédé de détection de la PrP de l'invention comprend l'étape supplémentaire d'ajout de protéinase K dans l'échantillon. Cette étape de digestion par la protéinase K peut être réalisée soit avant réticulation de la PrP avec ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique, soit après une telle réticulation.

Selon encore un autre mode, le procédé de l'invention comprend les étapes consistant à :

a) ajouter audit échantillon de la protéinase K pour digérer la PrP<sup>c</sup>,

b) ajouter au mélange ainsi obtenu ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique pour obtenir des agrégats de PrP,

c) ajouter un ligand autre qu'un ligand protéique et

5 d) révéler la présence de PrP<sup>res</sup>.

Les agrégats de PrP, formés en présence de la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et contenant la PrP, peuvent être séparés du milieu réactionnel avant leur réaction avec le ligand autre qu'un ligand protéique, qu'il y ait ou non traitement préalable avec la protéinase K. Le procédé de  
10 séparation est mis en œuvre par tout procédé de séparation d'un précipité connu de l'homme du métier. A titre d'exemple, les agrégats de PrP sont séparés du milieu réactionnel par centrifugation, puis par élimination du surnageant. Cette étape de séparation permet d'éliminer tous produits non nécessaires à la réaction de détection ultérieure de la PrP tels que la protéinase K le cas échéant, les protéines digérées et la  
15 molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique libre en solution.

Pour améliorer davantage la sensibilité du procédé de détection de l'invention, avant la réaction des agrégats de PrP avec le ligand autre qu'un ligand protéique, on peut procéder également à une dénaturation desdits agrégats présents dans l'échantillon  
20 biologique à tester. Cette étape de dénaturation peut être mise en œuvre par tout procédé de dénaturation d'agrégats protéiques connu de l'homme du métier. De préférence, la dénaturation est mise en œuvre par ajout de guanidine HCl.

Ainsi, le procédé de détection de la PrP selon l'invention comprend de préférence au moins l'une des étapes supplémentaires i) et ii) suivantes consistant à :

25 i) séparer les agrégats de PrP du mélange réactionnel et

ii) dénaturer les agrégats de PrP.

ces étapes étant incluses le cas échéant entre l'étape b) et l'étape c).

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé de détection de l'invention met en œuvre les deux étapes i) et ii) successivement, de préférence entre l'étape b) et  
30 l'étape c).

La révélation de la présence de la PrP dans un échantillon biologique selon le

procédé de l'invention peut être mise en œuvre selon les procédés classiques de détection d'analytes dans un échantillon.

Elle peut par exemple être mise en œuvre par une détection immunologique ou non.

5 Par détection immunologique, on entend la mise en évidence d'une réaction immunologique avec la PrP, cette réaction immunologique consistant en la liaison entre la PrP à détecter et un partenaire de liaison spécifique de la PrP ou bien en une réaction de compétition entre la PrP susceptible d'être contenue dans l'échantillon à tester et de la PrP marquée.

10 A titre de détection non immunologique, on peut citer par exemple les techniques de coloration sur gel d'électrophorèse bien connues de l'homme du métier.

La détection de la PrP par réaction immunologique peut-être mise en œuvre par exemple après addition d'un partenaire de liaison spécifique de la PrP.

15 Par partenaire de liaison spécifique de la PrP, on entend tout partenaire capable de se lier à la PrP. La visualisation de la réaction immunologique consistera alors en la visualisation du complexe partenaire de liaison spécifique de la PrP/PrP.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention est tel qu'on ajoute un partenaire de liaison spécifique de la PrP pour la réaction immunologique entre le partenaire de liaison spécifique de la PrP et la PrP, le cas échéant dans l'étape  
20 d).

A titre de partenaire de liaison spécifique de la PrP, on peut citer, par exemple, les anticorps, les fragments d'anticorps, les polypeptides, les protéines, les acides nucléiques, les haptènes et les aptamères.

25 Le terme « anticorps » inclut les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, les anticorps obtenus par recombinaison génétiques et des fragments d'anticorps.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un antigène cible d'intérêt, dans le cas présent la PrP, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum,  
30 notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment la PrP.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un antigène cible d'intérêt, le cas présent la PrP, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit antigène. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (murines dans l'exemple) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis de l'antigène d'intérêt pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

A titre d'anticorps appropriés pour l'invention, on peut citer par exemple les anticorps 8G8, 12F10 (SpiBio, France) et 3F4 (Immunok).

Les fragments d'anticorps sont tels qu'ils conservent la fonction de liaison la PrP.

Par « polypeptide », on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés. Par acides aminés, on entend les acides aminés primaires qui codent pour les protéines, les acides aminés dérivés après action enzymatique comme la *trans*-4-hydroxyproline et les acides aminés naturels, mais non présents dans les protéines comme la norvaline, la N-méthyl-L-leucine, la sélénométhionine (Hunt S. dans Chemistry and Biochemistry of the amino acids, Barrett GC, ed., Chapman and Hall, London, 1985), les acides aminés protégés par des fonctions chimiques utilisables en synthèse sur support solide ou en phase liquide et les acides aminés non naturels.

Le terme « protéine » inclut les holoprotéines et les hétéroprotéines comme les nucléoprotéines, les lipoprotéines, les phosphoprotéines, les métalloprotéines et les glycoprotéines aussi bien fibreuses que globulaires.

Par acide nucléique, on entend les oligonucléotides, les acides désoxyribonucléiques et les acides ribonucléiques, ainsi que leurs dérivés.

Le terme « oligonucléotide » désigne un enchaînement d'au moins 2 nucléotides (désoxyribonucléotides ou ribonucléotides, ou les deux), naturels ou modifiés. Par  
5 nucléotide modifié, on entend par exemple un nucléotide comportant une base modifiée et/ou comportant une modification au niveau de la liaison internucléotidique et/ou au niveau du squelette. A titre d'exemple de base modifiée, on peut citer l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine et la bromo-5-désoxyuridine. Pour illustrer une liaison internucléotidique modifiée, on  
10 peut mentionner les liaisons phosphorothioate, N-alkylphosphoramidate, alkylphosphonate et alkylphosphodiester. Les alpha-oligonucléotides tels que ceux décrits dans FR-A-2 607 507, les LNA tels que phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA décrits dans Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 8, Issue 16, 18 August 1998, pages 2219-2222, et les PNA qui font l'objet de l'article de M. Egholm et  
15 al., J. Am. Chem. Soc. (1992), 114, 1895-1897, sont des exemples d'oligonucléotides constitués de nucléotides dont le squelette est modifié.

Le terme « haptène » désigne des composés non immunogènes, c'est-à-dire incapables par eux-mêmes de promouvoir une réaction immunitaire par production d'anticorps, mais capables d'être reconnus par des anticorps obtenus par immunisation  
20 d'animaux dans des conditions connues, en particulier par immunisation avec un conjugué haptène-protéine. Ces composés ont généralement une masse moléculaire inférieure à 3000 Da, et le plus souvent inférieure à 2000 Da, et peuvent être par exemple des peptides glycosylés, des métabolites, des vitamines, des hormones, des prostaglandines, des toxines ou divers médicaments, les nucléosides et les nucléotides.

25 Les aptamères sont des partenaires de capture de nature protéique et nucléique qui ont pour fonction d'agir en tant qu'anticorps et de se lier à des ligands protéiques (Toulmé, J.J. et Giege, R., 1998, Medecine Science, 14(2), 155-166).

Ces polypeptides, protéines, haptènes et aptamères ont tous la capacité de se lier à la PrP ou à l'agrégat de PrP.

30 La visualisation de la réaction immunologique entre le partenaire de liaison spécifique de la PrP et la PrP mise en œuvre, notamment dans l'étape d), peut être



effectuée par tout moyen de détection connu de l'homme du métier, tels que des moyens directs ou indirects.

Dans le cas de la détection directe, c'est-à-dire sans l'intermédiaire d'un marquage, on observe la réaction immunologique par exemple par résonance plasmon  
5 ou par voltamétrie cyclique sur une électrode portant un polymère conducteur.

Dans le cas de la détection indirecte, c'est-à-dire par l'intermédiaire d'un marquage, le marquage peut être effectué par l'intermédiaire dudit partenaire de liaison spécifique de la PrP qui sera alors préalablement marqué.

La visualisation de la présence de la PrP dans un échantillon biologique selon le  
10 procédé de l'invention peut également être mise en œuvre selon une méthode dite de compétition. On ajoute alors, notamment dans l'étape d), à la place du partenaire spécifique de liaison de la PrP, de la PrP préalablement marquée. Dans ce cas, le signal de détection est maximal en l'absence de PrP, puis diminue progressivement à mesure que la concentration en PrP recherchée, non marquée, augmente par la réaction de  
15 compétition.

Par marquage, on entend la fixation d'un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable. Une liste non limitative de ces marqueurs consiste en :

- les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie,  
20 fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la  $\alpha$ -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- les chromophores comme les composés, luminescents, colorants,
- les molécules radioactives comme le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$  ou le  $^{125}\text{I}$ ,
- les molécules fluorescentes telles que la fluorescéine, la rhodamine, l'alexa ou les  
25 phycocyanines, et
- les particules telles que les particules en or, en latex magnétique, les liposomes.

Des systèmes indirects peuvent être aussi utilisés, comme par exemple par l'intermédiaire d'un autre couple ligand/antiligand. Les couples ligand/antiligand sont bien connus de l'homme du métier, et on peut citer par exemple les couples suivants :  
30 biotine/streptavidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le

ligand qui porte l'agent de liaison. L'antiligand peut être détectable directement par les marqueurs décrits au paragraphe précédent ou être lui-même détectable par un ligand/anti-ligand.

Ces systèmes de détection indirects peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal. Cette technique d'amplification du signal est bien connue de l'homme du métier, et l'on pourra se reporter à l'article J. Histochem. Cytochem. 45 : 481-491, 1997.

Le marquage de protéines est largement connu de l'homme du métier et est décrit par exemple par Greg T. Hermanson dans Bioconjugate Techniques, 1996, Academic Press Inc, 525B Street, San Diego, CA92101 USA.

Selon le type de marquage utilisé, comme par exemple en utilisant une enzyme, l'homme du métier ajoutera des réactifs permettant la visualisation du marquage.

De tels réactifs sont largement connus de l'homme du métier et sont décrits notamment dans Principles and Practice of Immunoassay, 2<sup>nd</sup> Edition, Edited by C. Price, D.J. Newman Stockton Press, 1997, 345 Park Avenue South, New York.

La détection de la PrP peut être une détection en phase solide, c'est-à-dire utilisant une phase solide sur laquelle est immobilisé un partenaire de capture destiné à la capture de la protéine à détecter. Dans le cas de la présente invention, c'est le ligand autre qu'un ligand protéique qui sert de partenaire de capture préalablement immobilisé sur un support solide. Un exemple de détection en phase solide bien connu de l'homme du métier est la détection de type sandwich, telle que la détection de type ELISA.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le ligand autre qu'un ligand protéique est lié à un support solide.

A titre de support solide, on peut citer par exemple les billes, telles que les billes magnétiques, et les plaques de microtitrage.

Le ligand autre qu'un ligand protéique peut être lié au support solide de façon connue de l'homme du métier, telle que par adsorption ou liaison covalente, la liaison covalente étant préférée.

Ainsi, le support solide peut être fonctionnalisé par une fonction susceptible de former une liaison avec une fonction portée par le ligand. Suivant un mode de réalisation préféré, le support solide est fonctionnalisé par une liaison NHS (N-

hydroxysuccinimide) ou par une fonction  $\text{NH}_2$ . Cette fonction peut réagir avec une fonction portée sur le ligand. Dans ce mode de réalisation, les ligands portant une fonction susceptible de réagir pour former une liaison avec la liaison fonctionnelle du support solide, notamment portant une liaison  $\text{NH}_2$  ou  $\text{COOH}$ , sont particulièrement  
5 préférés.

Des exemples de ligands autre que des ligands protéiques comprennent par exemple les ligands macrocycliques et les glycosaminoglycanes.

Ces ligands ont tous la particularité, à la différence des ligands protéiques, d'amplifier la sensibilité de détection de la protéine PrP.

10 Selon un mode de réalisation de l'invention, le ligand autre qu'un ligand protéique est choisi parmi les ligands macrocycliques et les glycosaminoglycanes.

Les glycosaminoglycanes sont largement connus de l'homme du métier et sont décrits par exemple dans Polysaccharides, M. Yalpani, Elsevier, Amsterdam, 1988.

15 A titre de glycosaminoglycanes appropriés aux fins de l'invention, on peut citer par exemple l'héparine, le sulfate de chondroïtine, le sulfate de dermatane, l'acide hyaluronique et le sulfate de kératane.

Par ligand macrocyclique, on entend un composé constitué d'une succession de cycles formant un macrocycle.

20 Les ligands macrocycliques sont connus de l'homme du métier. A titre d'exemples non limitatifs, on peut citer les cyclophanes, les métacyclophanes, les cyclodextrines, les cyclo(tétra-acides chromotropiques), les sphérands et les cyclo[n]véatrylènes.

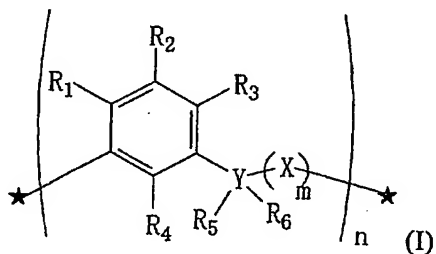
Les ligands macrocycliques ont pour avantage particulier qu'ils permettent de piéger la protéine à tester, sous forme libre ou sous forme d'agrégat, par un effet cage.

25 Les ligands macrocycliques peuvent être préparés selon les techniques connues de l'homme du métier, par exemple décrites dans Comprehensive Supramolecular Chemistry, Pergamon, Oxford, 1996.

Les ligands macrocycliques préférés pour le procédé de l'invention sont choisis parmi les métacyclophanes, les calix-arènes étant particulièrement préférés. De tels  
30 composés calix-arènes peuvent être obtenus suivant la méthodologie décrite dans Arduini, A. et al., 1996, Macrocycle Synthesis, Eds. Harwood, L.M. & Moddy, C.J.

Oxford University Press, Oxford et Da Silva et al., 2001, J. Supramol. Chem., 1 :135-138.

Selon un mode de réalisation préféré, le ligand macrocyclique de l'invention répond à la formule générale (I) suivante :



dans laquelle

$R_1$  représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR, R étant tel que défini ci-dessous,

$R_2$  représente un atome d'hydrogène, un groupe R, COR, Pol,  $\text{CH}_2\text{Pol}$ , dans lesquels Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, ammonium, acide carboxylique et R est tel que défini ci-dessous,

$R_3$  représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

$R_4$  représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR, un groupe  $\text{OCH}_2\text{R}$  ou un groupe OCOR, dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

Y est un atome de carbone, d'azote, ou un atome de soufre,

$R_5$  et  $R_6$ , chacun indépendamment, sont absents ou représentent un atome d'hydrogène, un groupement  $\text{CH}_2$  ou R tel que défini ci-dessous, ou bien

$R_5$  et  $R_6$  représentent ensemble un atome d'oxygène ou de soufre,

X représente un groupement  $\text{CH}_2$ , ou un atome d'oxygène ou de soufre,

m représente un entier égal à 0 ou 1,

R représente un atome d'hydrogène ou une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

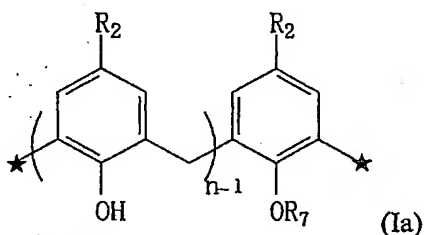
n est un entier compris entre 3 et 15,

les substituants  $R_1$  à  $R_5$ , R, X, Y et l'entier m peuvent être de nature différente suivant les motifs.

Ainsi, le composé de formule (I) se présente sous forme d'une succession de  $n$  motifs caractérisés par la présence d'un cycle benzénique, et les substituants de ce cycle peuvent être variables d'un motif à l'autre, dans la limite de leurs définitions ci-dessus.

Les chaînes hydrocarbonées, saturées ou non, ramifiées ou non, cycliques ou non cycliques, substituées ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires, sont largement connues de l'homme du métier. A titre d'exemples, on peut citer les alkyles, les alcènes, les aryles et les cycles saturés tels que le cyclohexane. Un exemple de groupement non polaire est  $\text{CF}_3$  et des exemples de groupements polaires sont les substituants Pol tels que définis précédemment.

Les composés de formule (I) particulièrement préférés répondent à la formule (Ia) suivante :



dans laquelle

$n$  est un entier compris entre 4 et 8,

chaque groupement  $R_2$ , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate

$R_7$  représente un groupement  $(\text{CH}_2)_t-(\text{CO})_s-(\text{NH}_2)$  ou un groupement  $(\text{CH}_2)_t-\text{COOH}$  où  $t$  est un entier compris entre 0 et 6 et  $s$  est un entier compris entre 0 et 6.

Les composés de formule (Ia) particulièrement préférés sont ceux pour lesquels les deux groupements  $R_2$  sont chacun un groupement sulfate,  $n$  est 4, 6 ou 8, et  $R_7$  est un atome d'hydrogène, un groupement  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ , un groupement  $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$  ou un groupement  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ , ce qui constitue un mode de réalisation de l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré, le ligand macrocyclique répond à la formule générale (Ia) dans laquelle  $n=6$ ,  $X=Y=\text{sulfate}$  et  $R_7$  est  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ .

Pour la mise en œuvre du procédé de détection immunologique de la PrP pathogène de l'invention, on peut utiliser des kits de diagnostic comprenant un ligand

~~autre qu'un ligand protéique, de préférence un ligand macrocyclique, et une molécule~~  
ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique.

Selon un mode de réalisation préféré, ledit ligand autre qu'un ligand protéique  
présent dans le kit est lié à un support solide pour la mise en œuvre de la détection de la  
5 PrP pathogène selon un procédé de détection en phase solide.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants donnés à titre  
illustratif et non limitatif, ainsi qu'à l'aide des figures 1 à 7, dans lesquelles :

- la figure 1 est une représentation graphique donnant les valeurs de DO  
obtenues après détection par le procédé de l'invention de PrP<sup>res</sup> dans des échantillons de  
10 sérum de souris, de sérums d'ovins et de plasmas de bovins, positifs (+) ou négatifs (-),

- la figure 2 est une représentation graphique donnant les valeurs de DO  
obtenues après détection par le procédé de l'invention de PrP<sup>res</sup> dans des échantillons de  
plasmas de bovins positifs (plasma +) ou négatifs (plasma -) en utilisant deux anticorps  
de révélation différents,

15 - la figure 3 est une représentation graphique donnant les valeurs de DO  
obtenues après détection par le procédé de l'invention de PrP<sup>res</sup> dans des échantillons de  
sérums et de plasmas humains positifs vis-à-vis de la maladie de Creutzfeld-Jakob  
(MCJ +) ou négatifs (MCJ -) en utilisant deux anticorps de révélation différents,

- la figure 4 est une représentation schématique (figure 4A) d'un gel  
20 d'électrophorèse (figure 4B) à la suite d'un Western Blot, obtenu après migration  
d'échantillons de cerveau bovin de BSE traités soit par du sesquisulfate de  
streptomycine (pistes 5-7 et 13-15), soit par de la streptomycine (pistes 2-4 et 10-12),  
les pistes 1 et 9 correspondant au témoin non traité et la piste 8 correspondant à la piste  
des marqueurs de poids moléculaire,

25 - la figure 5 est une représentation schématique (figure 5A) d'un gel  
d'électrophorèse (figure 5B) à la suite d'un Western Blot, obtenu après migration  
d'échantillons de cerveau bovin de BSE traités par des quantités croissantes de  
triéthylènetétramine (pistes 2-6), la piste 1 correspondant au témoin non traité et la piste  
8 correspondant à la piste des marqueurs de poids moléculaire,

30 - la figure 6 est une représentation schématique (figure 6A) d'un gel  
d'électrophorèse (figure 6B) à la suite d'un Western Blot, obtenu après migration

d'échantillons de cerveau bovin de BSE traités par des quantités croissantes de bis-3-aminopropylamine (pistes 3-7), la piste 2 correspondant au témoin non traité et la piste 1 correspondant à la piste des marqueurs de poids moléculaire, et

5 -la figure 7 est une représentation schématique (figure 7A) d'un gel d'électrophorèse (figure 7B) à la suite d'un Western Blot, obtenu après migration d'échantillons de cerveau bovin de BSE traités par de la streptomycine et le calix-arène p-sulfonato-3,7-(2-aminoéthoxy)-calix-[6]-arène (pistes 7 à 15), les pistes 1 à 3 correspondant aux échantillons témoin sans ajout de streptomycine ni de calix-arène et les pistes 4 à 6 correspondant aux échantillons dans lesquels seul le calix-arène a été  
10 ajouté.

#### **Exemple 1 : prétraitement des échantillons**

##### **1. Echantillons d'organes solides tels qu'extrait de cerveau, non traités à la streptomycine**

15 Les organes (cerveau, etc.) sont tout d'abord homogénéisés dans une solution de glucose à 5% (p/v) afin d'obtenir une suspension à 10%.

A 100µL de la solution homogénéisée décrite ci-dessus sont ajoutés 5µL d'une solution de la protéinase K (PK) dosée à 2mg/L, 1 µL d'une solution de SDS à 10% et 6µL d'une solution de N-octyl-β-D-glyco-pyranoside à 2.5% p/v dans l'eau.

20 Le mélange est agité au vortex puis incubé à 37°C pendant 60 minutes.

500µL d'un mélange chloroforme : méthanol (1 : 2) sont ensuite ajoutés et le mélange est soumis à une agitation au vortex.

Ceci est suivi d'une étape de centrifugation à 15000tr/min à température ambiante pendant 10 minutes

25 Le surnageant est alors éliminé et le culot est remis en suspension dans 25µL d'une solution d'hydrochlorure de guanidine à 6M. La suspension est incubée à 37°C pendant 30 minutes.

Enfin, 400µL d'une solution de PBS et du Tween 20 (0.05% p/v) sont ajoutés.

##### **2. Echantillons d'organes solides tels qu'extrait de cerveau, traités à la streptomycine**

30

Les organes (cerveau, rate etc.) sont tout d'abord homogénéisés dans une

~~solution de glucose à 5% (p/v) afin d'obtenir une suspension à 10%.~~

A 100µL de la solution homogénéisée décrite ci-dessus sont ajoutés 5µL d'une solution de la protéinase K (PK) dosée à 2mg/L et 20 µl d'une solution de N-octyl-β-D-glyco-pyranoside à 2.5% p/v dans l'eau. Le mélange est agité au vortex puis incubé à 37°C pendant 30 minutes.

20 µL d'une solution de sulfate de streptomycine à une concentration de 1g/mL sont ajoutés, le mélange est placé sous agitation et re-incubé à 37°C pendant 1 heure.

500µL d'un mélange chloroforme : méthanol (1 : 2) sont ensuite ajoutés et le mélange est soumis à une agitation au vortex.

Ceci est suivi d'une étape de centrifugation à 10 000 tr/min à température ambiante pendant 10 minutes.

Le surnageant est alors éliminé et le culot est remis en suspension dans 25µL d'une solution d'hydrochlorure de guanidine à 6M. La suspension est incubée à 37°C pendant 30 minutes.

Enfin, 400µL d'une solution de PBS et du Tween 20 (0.05% p/v) sont ajoutés.

### 3. Echantillons de fluides biologiques tels que sérum et plasma, traités à la streptomycine

Une solution de protéinase K est ajoutée à 100µL de sérum ou plasma de sorte que la concentration finale en enzyme soit de 80 µg/mL. La solution est ensuite mélangée au vortex et incubée à 37°C pendant 30 minutes.

20µL d'une solution de sulfate de streptomycine à une concentration de 1g/mL sont ajoutés, le mélange est placé sous agitation et re-incubé à 37°C pendant 1 heure.

Après centrifugation à 15000tr/min pendant 10 minutes, le surnageant est rejeté.

Le culot résiduel est remis en suspension dans 25µL d'une solution d'hydrochlorure de guanidine à 6M dans l'eau à l'aide d'une agitation au vortex. La suspension est ensuite incubée à 37°C pendant 30 minutes.

Puis sont ajoutés 400µL d'une solution de PBS (Phospahte Buffer Saline) avec 0,05% (p/v) de tampon Tween 20, le mélange est agité au vortex.

### 4. Echantillon de fibrilles (SAF) de PrP<sup>sc</sup> digérées (PrP<sup>res</sup>) purifiées, préparé à partir du système nerveux

Les organes (cerveau, etc.) sont tout d'abord homogénéisés dans une solution de



glucose à 5% (p/v) afin d'obtenir une suspension à 10% et filtrés.

La PK est utilisée à raison de 25 µg pour 100 mg de tissu. Après homogénéisation au vortex, le tube est placé 1 heure à l'étuve à 37°C.

L'action de la PK est stoppée par homogénéisation avec du Péfabloc® à 10 mM.

La préparation de l'ultracentrifugation comporte l'homogénéisation de 1000 µl de broyat digéré avec 600 µl de Sarkosyl à 30%. Le mélange est laissé au moins 15 minutes à température ambiante avant d'être transféré sur coussin de saccharose (400 µl de saccharose 10%) dans des tubes pour ultracentrifugation (Beckman, Quick Seal, 2,2 ml). Le tube est complété avec de l'eau ultra pure, puis soudé et placé dans le rotor pour ultracentrifugation.

Celle-ci dure 2 heures à 100 000 rpm et 20°C.

Les 2/3 du surnageant, dont la fraction lipidique, sont ensuite aspirés. Le culot est séché par retournement sur papier absorbant.

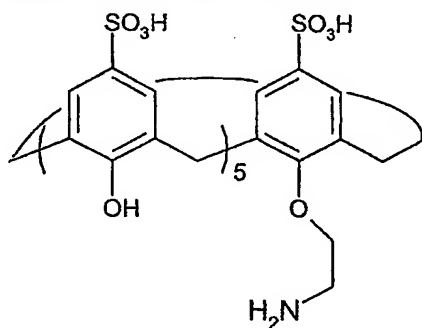
Puis le culot est repris par 100 ou 200 µl de PBS pour une utilisation immédiate ou de tampon de dénaturation pour congélation. Dans ce dernier cas, les culots sont chauffés pendant 10 minutes à 100°C. Après refroidissement, les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 12000 rpm à 20°C. Les surnageants sont congelés à -80°C.

Ces échantillons servent de standards « positifs » de PrP<sup>res</sup> purifiée.

## Exemple 2 : Préparation du ligand calix-arène *p*-sulphonato-3,7-(2-amino-éthoxy)-calix-[6]-arène (dénommé C6S)

### 1. Préparation

Ce ligand adjuvant macrocyclique C6S possède la formule générale :



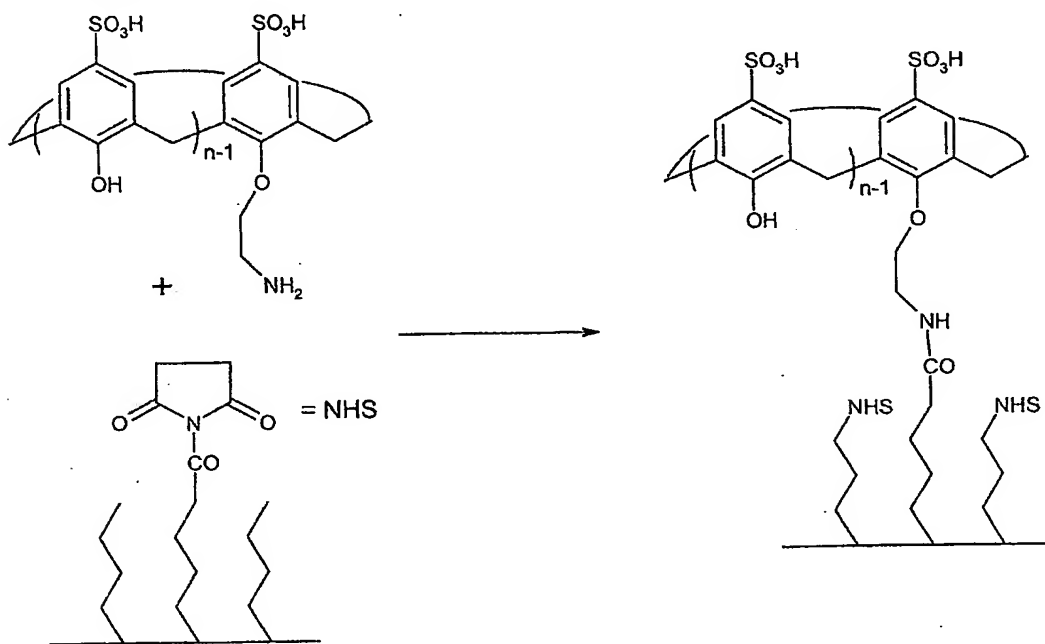
~~Ce ligand est préparé selon la méthode décrite dans Eric Da Silva et~~  
Anthony W. Coleman, Synthesis and complexation properties towards amino acids of  
mono-substituted p-sulphonato-calix-[n]-arene, Tetrahedron 59 (2003) 7357-7364.

Ce ligand peut ensuite être couplé avec un support solide (bille ou plaque)  
5 portant une surface activée comme indiqué ci-après.

### 2. Greffage du ligand C6S sur plaques

Les plaques « NHS activated plates » de 96 puits proviennent de la société  
Covalab (Lyon, France). 100µL d'une solution de ligand sont dissous à différentes  
concentrations dans du Tampon Phosphate 50mM pH 8,2. Les puits sont lavés 3 fois (3  
10 x 200µL) à l'eau MilliQ après deux heures d'incubation à 37°C. Les plaques sont  
séchées à température ambiante avant leur utilisation.

Schéma de greffage :



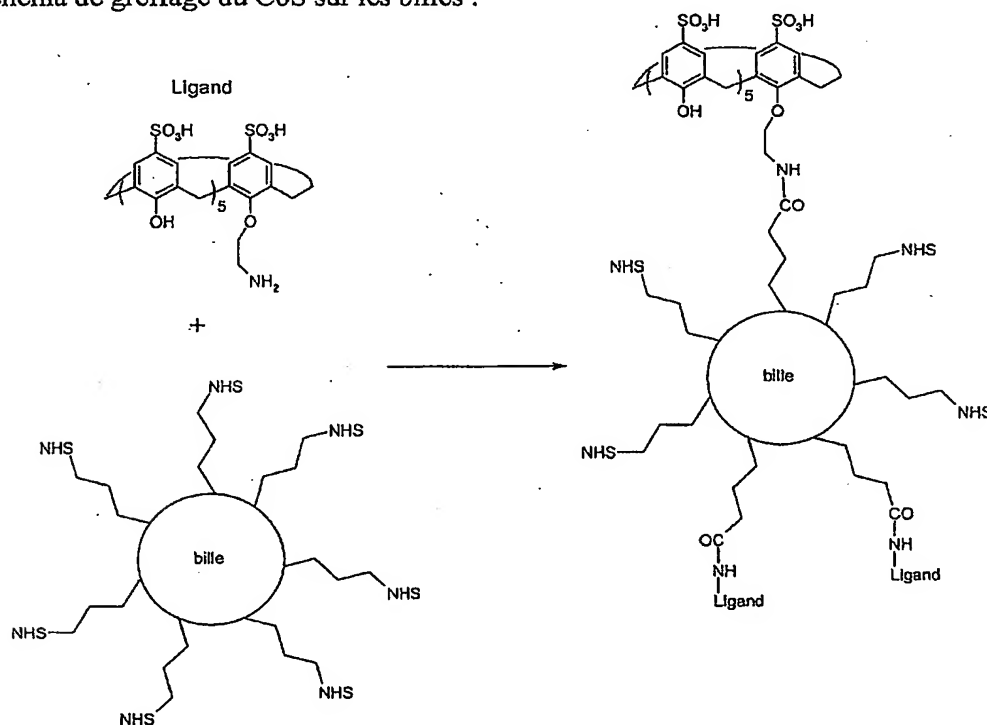
15

### 3. Greffage sur billes :

4 mL d'une solution de bille activée NHS ( $2 \times 10^9$  billes /mL ; Dynabeads®  
M270Amine, Société Dynal, Norvège) sont aliquotés en tubes de 1 mL. Les billes sont  
centrifugées et précipitées par aimantation. Le surnageant est enlevé et les billes sont  
lavées 3 fois avec 1 mL d'eau. Le culot de bille est repris avec différents volumes de

- solution de calixarène dans un tampon phosphate 50mM pH 8,2. 600  $\mu$ L, 120  $\mu$ L, 60  $\mu$ L et 12  $\mu$ L d'une solution de ligand à 50 mg/mL (tampon phosphate 50mM, pH 8,2) sont ajoutés. Les billes sont agitées pendant 24 heures à température ambiante. Les billes sont lavées 3 fois avec de l'eau MilliQ 18 $\Omega$  afin d'éliminer le ligand qui n'a pas réagi.
- 5 Les billes sont conservées dans 1 mL d'eau afin de reconstituer la concentration initiale de  $2 \times 10^9$  billes / mL. La solution de bille est prête à l'emploi. Ces billes sont définies comme « billes C6S » dans tout le texte.

Schéma de greffage du C6S sur les billes :



10

### **Exemple 3 : Détection de la PrP<sup>res</sup>**

#### **1. Echantillons utilisés**

- Les échantillons de cerveaux, sérum, plasma bovins positifs sont issus d'animaux dont l'atteinte par une maladie à prion EST (Encéphalite Spongiforme Transmissible) a été confirmée par les méthodes classiques de référence dont une
- 15 recherche par Western blot de PrP<sup>res</sup> dans le tissu cérébral comme décrite par Madec et al, 2000, Microbiol pathogenesis, 28 : 353-362. Les témoins négatifs correspondent à

des échantillons de cerveaux, sérum et plasma d'animaux pour lesquels l'atteinte par les maladies à prion a été exclue par les mêmes analyses. L'anti-coagulant utilisé pour les prélèvements de plasma est l'EDTA.

Ces échantillons sont fournis par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité  
5 Sanitaire des Aliments) Lyon FRANCE.

## 2. Détection de la PrP<sup>tes</sup> selon une méthode de type ELISA

Avant utilisation, les puits des plaques obtenues selon l'exemple 2, point 2 ci-dessus sont pré-saturées par un traitement par un mélange lait écrémé (5%) et PBS/Tween 20 (0.05% p/v) à 37°C pendant 60 minutes. Les puits sont ensuite lavés 3  
10 fois avec 800µL de PBS/Tween 20 (0.05% p/v) par puit. Le tampon résiduel est éliminé par retournement.

100µL de chaque échantillon de fluide biologique préparé selon l'exemple 1, point 3 ci-dessus, sont distribués dans les puits et la plaque est incubée à 37°C pendant 100 minutes sous agitation mécanique à 400 tr/min.

15 Suite à cette première incubation, chaque puit est relavé trois fois avec 800 µL du mélange PBS / Tween 20 (0.05% p/v) puis les plaques sont séchées.

L'anticorps anti-PrP de révélation, marqué par à la peroxydase et dilué à 0.05µg/mL dans le mélange PBS / Tween 20 (0.05% p/v) est ajouté à raison de 100µL par puit et la plaque est incubée de nouveau à 37°C pendant 60 minutes. L'anticorps  
20 utilisé reconnaît la région définie par les acides aminés 145-154 de la PrP humaine et les régions homologues des PrP animales (anticorps AC23).

La plaque est alors rincée trois fois avec 800µL d'une solution de PBS/Tween 20 (0.05% p/v) (PW41, Sanofi Pasteur) et le tampon résiduel est éliminé par retournement.

25 La révélation est effectuée par ajout de 100µL dans chaque puit, d'une solution de révélation préparée selon les recommandations du fabricant (kit bioMérieux). La plaque est incubée à température ambiante dans le noir pendant 10 minutes.

La réaction est stoppée par ajout de 50µL d'une solution d'acide sulfurique (1.8N).

30 La lecture du signal obtenu est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 490nm (Spectrophotomètre PR2100, Biorad).

### 3. Détection de la PrP<sup>res</sup> dans le cerveau selon la technique Western Blot

Le protocole utilisé correspond au protocole de référence utilisé pour le diagnostic de certitude des maladies à prion chez l'animal et décrit par Madec et al, 2000, Microbiol pathogenesis, 28 : 353-362.

### 4. Résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1 : Représentation de la spécificité de détection par la méthodologie de type ELISA précédemment décrite de la PrP<sup>res</sup> dans le sérum et le plasma de bovins par comparaison avec le protocole de référence de type Western Blot effectué à partir du

		ELISA			
		<i>Sérum</i>		<i>Plasma</i>	
		Positif	Négatif	Positif	Négatif
<b>Western Blot</b>	Positif	6	0	3	0
	Négatif	0	8	0	1
<i>Cerveaux</i>					

Ces résultats montrent bien que le procédé de l'invention permet de détecter la PrP dans les fluides biologiques en raison de la concordance entre les deux tests (procédé de l'invention et Western Blot de référence).

Par ailleurs, le procédé de l'invention est également applicable aux fluides physiologiques tels que les sérums et plasmas.

### Exemple 4 : Application du procédé de l'invention aux différentes espèces

#### 1. Echantillons

Outre les échantillons utilisés dans l'exemple 3 ci-dessus, on a utilisé des échantillons de cerveaux, sérum, plasma ovins positifs issus d'animaux dont l'atteinte par la maladie à prions scrapie (tremblante) a été confirmée par une recherche par Western blot de PrPres dans le tissu cérébral, ainsi que des plasmas d'ovins infectés par une souche d'ESB provenant de cerveaux bovins (comptabilisés comme bovin positif).

Les échantillons de sérum murin ont été prélevés sur des souris C57BL6 auxquelles ont été préalablement inoculés par injection intra-péritonéale, 100 µl d'une suspension de cerveau de mouton atteint par une souche de scrapie C506M3 adaptée à la souris, à 10% dans une solution de glucose 5% et diluée au 1/200<sup>ème</sup>. Le sang a été collecté au niveau du sinus orbital 15 jours après l'inoculation.

Ces échantillons ont également été fournis par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) Lyon FRANCE.

2. Détection de la PrP<sup>res</sup> dans les fluides biologiques selon une méthode de type ELISA

On a repris le protocole décrit dans l'exemple 3, point 2 ci-dessus.

3. Résultats

Les résultats sont reportés sur la figure 1 donnant les valeurs de DO obtenues dans des échantillons de sérum de souris, de sérums d'ovins et de plasmas de bovins, positifs ou négatifs (+ ou -).

Cette figure met en évidence que, de façon surprenante, quelle que soit l'espèce considérée, la valeur de densité optique des échantillons issus d'animaux atteints de maladie à prions est significativement positive comparée aux échantillons issus d'animaux témoins.

Le procédé de l'invention est donc applicable à différentes espèces.

Exemple 5 : Utilisation de différents anticorps dans le procédé de l'invention

1. Echantillons

On a utilisé des échantillons de bovin comme décrit dans l'exemple 3 ci-dessus.

2. Détection de la PrP<sup>res</sup> dans les fluides biologiques selon une méthode de type ELISA

On a repris le protocole décrit dans l'exemple 3, point 2 ci-dessus en utilisant comme anticorps de révélation, soit l'anticorps AC23 tel que décrit précédemment, soit l'anticorps 8D11G12 (bioMérieux, France).

3. Résultats

Les résultats sont reportés sur la figure 2 donnant les valeurs de DO obtenues dans des échantillons de plasmas de bovins positifs ou négatifs (+ ou -).

Cette figure met en évidence que le procédé de l'invention peut être mis en œuvre avec différents anticorps anti-PrP.

### **Exemple 6: Détection de la PrP<sup>res</sup> dans les organes solides**

#### **1. Echantillons**

Les échantillons utilisés correspondent :

i) à des échantillons de cerveau issus de bovins positifs et négatifs dont l'atteinte par une maladie à prion a été confirmée ou infirmée par les méthodes classiques de référence dont la recherche par Western Blot de PrP<sup>res</sup> dans le tissu cérébral et

ii) à des cerveaux et rates prélevés de souris déjà inoculés I/C par une souche de scrapie adaptée au souris et montrant des symptômes spécifiques de la maladie.

Ces échantillons ont été fournis par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) Lyon FRANCE.

Ils ont été traités comme indiqué dans l'exemple 1, point 2 ci-dessus.

#### **2. Détection de la PrP<sup>res</sup> dans les organes solides selon une méthode de type ELISA**

On a repris le protocole décrit dans l'exemple 3, point 2 ci-dessus.

#### **3. Résultats**

On a comparé les résultats obtenus sur les mêmes échantillons d'organe solide par la méthode de référence Western Blot avec ceux obtenus par le procédé de l'invention.

Les résultats mettent en évidence que l'utilisation du procédé de l'invention combinant à la fois l'utilisation de streptomycine lors de préparation des cerveaux et l'utilisation d'un calix-arène selon un procédé de type ELISA a permis la détection de PrP<sup>res</sup> dans tous les échantillons positifs.

Cette utilisation du procédé de l'invention permet également la détection de PrP<sup>res</sup> dans les cerveaux et rates prélevés de souris inoculées par une souche de scrapie adaptée aux souris.

**Exemple 7: Détection de la PrP<sup>res</sup> dans le sérum et le plasma humain****1. Echantillons**

Les échantillons utilisés correspondent à des échantillons de plasma et de sérum issus de patients positifs et négatifs dont l'atteinte par la maladie de Creutzfeldt-Jakob a été confirmée ou infirmée par les méthodes classiques de référence.

**2. Détection de la PrP<sup>res</sup> dans le sérum et le plasma selon une méthode de type ELISA**

On a repris le protocole décrit dans l'exemple 3, point 2 ci-dessus en utilisant comme anticorps de révélation, soit l'anticorps AC23 tel que décrit précédemment, soit l'anticorps 8D11G12 (bioMérieux, France).

**3. Résultats**

Les résultats sont indiqués sur la figure 3 qui est une représentation graphique donnant les valeurs de DO obtenues après détection par le procédé de l'invention de PrP<sup>res</sup> dans des échantillons de sérum et de plasmas humains positifs vis-à-vis de la maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ +) ou négatifs (MCJ -) en utilisant deux anticorps de révélation différents.

La figure 3 met en évidence que, de façon surprenante, le procédé de l'invention permet la détection de la PrP<sup>res</sup> de façon spécifique, dans le sérum et le plasma de patients humain atteints de MCJ.

Le procédé de l'invention est donc également applicable à l'homme.

**Exemple 8: Utilisation de différentes molécules ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique****1. Préparation des échantillons**

On a préparé l'échantillon à tester à partir d'homogénat de cerveau bovin BSE positif comme suit :

- aux 100 µl d'homogénat à 10% de cerveau bovin BSE positif mis en suspension dans une solution de glucose à 5 %, on a ajouté 1 µg de protéinase K puis on a incubé à 37°C° pendant une heure.
- puis on a ajouté 100 µl de tampon Laemmli, on a agité au vortex, on a chauffé 5 min à 100°C, on a centrifugé à 12000 tr/min pendant 5 minutes et on a récupéré les



surnageants.

On a utilisé des volumes de 5, 6, 8, 10 ou 50  $\mu$ l de cette suspension, correspondant à 250, 300, 400, 500 ou 2500  $\mu$ g de tissu de cerveau, pour les expériences décrites ci-dessous, avec ou sans ajout de molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique.

## 2. Western Blot

Après migration sur un gel d'électrophorèse unidimensionnelle de polyacrylamide 15% en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS PAGE) comme décrit par Laemmli, Nature 227 (1970), 680-685, les protéines sont transférées par électrophorèse sur des membranes nitrocelluloses et immunoblottées à température ambiante pendant 60 minutes avec un anticorps monoclonal (Spi-Bio, France) reconnaissant un épitope spécifique de la protéine prion constitué des acides aminés 146-160. L'anticorps secondaire de détection (1/5000) est un anticorps de chèvre dirigé contre les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines de souris conjugué à la peroxydase de radis (IgG H+L).

Les blots sont ensuite lavés et les signaux sont détectés par chimiluminescence soit avec un kit ECL (Amersham) sur des films (Biomex light, Kodak) ou avec un super Signal Ultra (Pierce) et visualisation sur Fluor S. Multimager (BioRad)

## 3. Détection de PrP<sup>sc</sup> en utilisant du sesquisulfate de dihydrestreptomycine

Cette molécule est une molécule ayant deux fonctions guanidinium et une fonction ammonium.

On a ajouté, à un volume constant de PrP<sup>sc</sup> (50 $\mu$ l) dans l'échantillon préparé dans le point 1 ci-dessus, des concentrations croissantes (0 ; 2,5 ; 5 et 10mg) de sesquisulfate de dihydrestreptomycine ou de Streptomycine à titre de comparaison.

Après incubation à 37°C pendant une heure, on a centrifugé à 12 000 tr/min pendant 5 minutes et on a récupéré le surnageant (surnageant de départ).

Les culots sont également récupérés et 50  $\mu$ l d'une solution v/v d'urée 8M et de tampon Laemmli, leur sont rajoutés. Après une vigoureuse agitation sous vortex, ils sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes et centrifugés à 12000 tr/min pendant 5 minutes. Enfin, on a récupéré les surnageants (surnageant de culot).

On a fait migrer les surnageants de départ ainsi que ceux des culots sur SDS

PAGE comme indiqué dans le point 2 ci-dessus.

Les résultats de ce test sont indiqués sur la figure 4 donnant une représentation graphique du gel d'électrophorèse obtenu après migration et où les différentes pistes 1 à 15 correspondent aux conditions de traitement données dans le tableau 2 suivant, avec ou sans les molécules à base de streptomycine.

Tableau 2

Piste	Conditions de traitement	Surnageant concerné
1	Sans ; témoin	Surnageant de départ
2	2,5 mg de streptomycine	Surnageant de départ
3	5 mg de streptomycine	Surnageant de départ
4	10 mg de streptomycine	Surnageant de départ
5	2,5 mg de sesquisulfate de dihydrostrept.	Surnageant de départ
6	5 mg de sesquisulfate de dihydrostrept.	Surnageant de départ
7	10 mg de sesquisulfate de dihydrostrept.	Surnageant de départ
8	Référence de Poids moléculaire	Aucun ; référence
9	Sans ; témoin	Surnageant de culot
10	2,5 mg de streptomycine	Surnageant de culot
11	5 mg de streptomycine	Surnageant de culot
12	10 mg de streptomycine	Surnageant de culot
13	2,5 mg de sesquisulfate de dihydrostrept.	Surnageant de culot
14	5 mg de sesquisulfate de dihydrostrept.	Surnageant de culot
15	10 mg de sesquisulfate de dihydrostrept.	Surnageant de culot

Comme indiqué sur la figure 4, en l'absence des molécules testées, toutes les bandes de PrP<sup>sc</sup> sont identifiées comme étant dans le surnageant et, en présence de Streptomycine ou sesquisulfate de dihydrostreptomycine, le matériel PrP<sup>sc</sup> est retrouvé dans le culot.

Les résultats montrent que le sesquisulfate de dihydrostreptomycine, comme la streptomycine, ajouté au milieu induit une réticulation de la PrP qui permet sa précipitation complète avec une centrifugeuse simple (pas besoin d'ultracentrifugation). Les agrégats ainsi obtenus peuvent permettre la détection de PrP, le cas échéant après réaction avec un ligand autre qu'un ligand protéique, selon le procédé de l'invention.

#### 4. Détection de PrP<sup>sc</sup> en utilisant du triéthylène tétramine ou TET

Cette molécule est une molécule ayant quatre fonctions ammonium.

Pour cette expérience, on a ajouté des concentrations croissantes de TET (105,

210, 420, 630 et 840 $\mu$ g) à des volumes constants (5 $\mu$ l) de PrP<sup>sc</sup> obtenus à partir de 250  $\mu$ g de cerveau d'un bovin atteint de BSE, préparé selon le point 1 ci-dessus. Le mélange a été immédiatement centrifugé à 12000 tr/min pendant 5 minutes et le surnageant a été utilisé pour la détection immunologique par Western blot.

5 Les résultats sont indiqués sur la figure 5 donnant une représentation graphique du gel d'électrophorèse obtenu après migration, où les différentes pistes 1 à 7 correspondent aux conditions de traitement données dans le tableau 3 suivant, avec ou sans TET.

Tableau 3

Piste	Condition de traitement
1	Sans traitement ; témoin
2	105 $\mu$ g de TET
3	210 $\mu$ g de TET
4	420 $\mu$ g de TET
5	630 $\mu$ g de TET
6	840 $\mu$ g de TET
7	Référence de Poids moléculaire

10

Les résultats sur la figure 5 montrent que l'accroissement de la quantité de Triéthylène tétramine dans le milieu par ajout de 105, 210, 420, 630 et 840 $\mu$ g, induit spontanément une augmentation de la masse moléculaire apparente de la protéine prion par rapport à un témoin sans molécule. Ainsi, la détection de la protéine prion est proportionnelle à la quantité de Triéthylène tétramine ajoutée. Ces résultats confirment que le TET produit les mêmes effets que la streptomycine sur la PrP, dans les conditions testées, à savoir une réticulation de la PrP proportionnelle à la dose de TET, objectivée par l'accroissement du poids moléculaire apparent des bandes ayant migré dans le gel d'acrylamide.

15

#### 5. Détection de PrP<sup>sc</sup> en utilisant de la bis-3-aminopropylamine

Cette molécule est une molécule ayant trois fonctions ammoniums.

On a répété le mode opératoire décrit dans le point 3 ci-dessus, à ceci près qu'on a ajouté, à des volumes constants (5 $\mu$ l) de PrP<sup>sc</sup> dans l'échantillon préparé dans le point 1 ci-dessus, des quantités croissantes de bis-3-aminopropylamine (130, 260, 520, 780 et 1040 $\mu$ g) et qu'on a incubé 30 min à température ambiante.

20

25

Les résultats sont indiqués sur la figure 6 donnant une représentation graphique du gel d'électrophorèse obtenu après migration du surnageant de culot, et où les différentes pistes 1 à 7 correspondent aux conditions de traitement données dans le tableau 4 suivant, avec ou sans bis-3-aminopropylamine.

Tableau 4

Piste	Condition de traitement
1	Référence de Poids moléculaire
2	Sans traitement ; témoin
3	130µg de bis-3-aminopropylamine
4	260µg de bis-3-aminopropylamine
5	520µg de bis-3-aminopropylamine
6	780µg de bis-3-aminopropylamine
7	1040µg de bis-3-aminopropylamine

Les résultats indiqués sur la figure 6 montrent que l'accroissement de la quantité de bis-aminopropylamine dans le milieu par ajout de 130, 260, 520, 780 et 1040µg, induit une augmentation de la masse moléculaire apparente des 3 bandes de la protéine prion par rapport à un témoin sans molécule. Dans ces conditions, la protéine prion précipite dans les conditions de centrifugation évoquées dans les points précédent, ce qui corrobore aussi des effets analogues à ceux produits par la streptomycine

#### 6. Conclusion

Les résultats montrent que les molécules testées ajoutées au milieu induisent une réticulation de la PrP qui permet sa précipitation complète avec une simple centrifugeuse.

Les agrégats ainsi obtenus peuvent permettre la détection de PrP, le cas échéant après réaction avec un ligand autre qu'un ligand protéique, selon le procédé de l'invention.

#### Exemple 9: Détection de la PrP<sup>res</sup> dans le cerveau de bovin par Western Blot par traitement de l'échantillon par un ligand autre qu'un ligand protéique et par une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique

Les échantillons utilisés correspondent à des échantillons de cerveaux issus de bovins positifs dont l'atteinte par une maladie à prion a été confirmée par les méthodes

classiques de référence dont la recherche par Western Blot de PrP<sup>res</sup> dans le tissu cérébral.

Les organes sont tout d'abord homogénéisés dans une solution de glucose à 5% (p/v) afin d'obtenir une suspension à 10%.

5 A 100µL de la solution homogénéisée décrite ci-dessus est ajouté 1µl d'une solution de calix-arene C6S à 0,1 M, puis le mélange est agité au vortex et incubé une heure à 37°C.

7 µL d'une solution de la protéinase K (PK) dosée à 2mg/L sont ajoutés et le mélange est agité au vortex puis incubé à 37°C pendant 30 minutes.

10 20 µL d'une solution de sulfate de streptomycine à une concentration croissante (5%, 10% et 20%) sont ajoutés, le mélange est placé sous agitation et re-incubé à 37°C pendant 1 heure.

Après avoir ajouté 100 µl de tampon Laemmli dénaturant, on chauffe à 100°C pendant 5 min et on centrifuge à 12000 tr/min pendant 5 min. Les surnageants sont  
15 rejetés et les culots sont récupérés. On leur ajoute 50 µl d'une solution à 50% v/v d'urée 8M et le tampon de Laemmli.

Après une vigoureuse agitation sous vortex, on chauffe à 100°C pendant 5 min et on centrifuge à 12000 tr/min pendant 5 min, puis on récupère les surnageants pour les faire migrer sur SDS-PAGE comme décrit par Laemmli, Nature 227 (1970), 680-685.

20 Après migration, les protéines sont transférées par électrophorèse sur des membranes de nitrocellulose et immunoblottées à température ambiante pendant 60 min avec un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope spécifique constitué des acides aminés 126-160 (Spi-Bio, France). L'anticorps secondaire (1/5000) est un anticorps de chèvre dirigé contre les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines  
25 de souris conjuguées à la peroxydase de radis (IgG H+L). Les blots sont ensuite lavés et les signaux sont détectés par chimioluminescence soit avec un kit ECL (Amersham) sur des films (Biomex light, Kodak) ou avec un super Signal Ultra (Pierce) et visualisation sur Fluor S. Multimager (BioRad).

Les résultats sont illustrés par la figure 7 sur laquelle les pistes 1 à 3  
30 correspondent aux échantillons témoin non traités par le calix-arène et la streptomycine, les pistes 4 à 6 correspondent aux échantillons traités au cali-arène seul (traitement

selon le mode opératoire ci-dessus, mais sans l'étape de traitement à la streptomycine) et les pistes 7 à 15 correspondent aux échantillons traités au calix-arène, puis à la streptomycine à raison de 5% (pistes 7 à 9), 10% (pistes 10 à 12) et 20% (pistes 13 à 15).

- 5 Les résultats mettent en évidence que la détection de PrP<sup>res</sup> est améliorée par l'utilisation de calix-arène et de streptomycine ensemble et que la sensibilité de ce procédé augmente avec la quantité de la streptomycine utilisée.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de la PrP dans un échantillon biologique d'origine humaine ou animale susceptible de contenir de ladite PrP, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et un ligand autre qu'un ligand protéique.

2. Procédé de détection de la PrP selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique est ajouté audit échantillon biologique pour la précipitation de la PrP avant l'ajout du ligand autre qu'un ligand protéique.

3. Procédé de détection de la PrP selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape supplémentaire d'ajout de protéinase K dans l'échantillon.

4. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- a) ajouter audit échantillon de la protéinase K pour digérer la PrP<sup>c</sup>,
- b) ajouter au mélange ainsi obtenu ladite molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique pour obtenir des agrégats de PrP,
- c) ajouter un ligand autre qu'un ligand protéique et
- d) révéler la présence de PrP<sup>res</sup>.

5. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'une des étapes supplémentaires i) et ii) suivantes consistant à :

- i) séparer les agrégats de PrP du mélange réactionnel et
  - ii) dénaturer les agrégats de PrP,
- ces étapes étant incluses le cas échéant entre l'étape b) et l'étape c).

6. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que on ajoute un partenaire de liaison spécifique de la PrP pour une réaction immunologique entre partenaire de liaison spécifique de la PrP et la PrP, le cas échéant dans l'étape d).

7. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le ligand autre qu'un ligand protéique est lié à un support solide.

8. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique est une molécule ayant au moins deux fonctions guanidinium et/ou ammonium, de préférence la streptomycine, de préférence encore sous forme de sel.

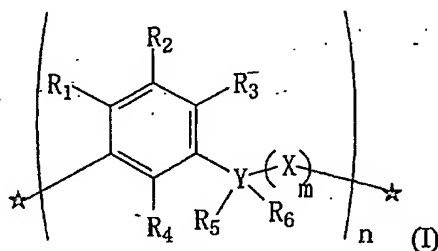
9. Procédé de détection de la PrP selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le ligand autre qu'un ligand protéique est choisi parmi les ligands macrocycliques et les glycosaminoglycanes, de préférence les ligands macrocycliques.

10. Procédé de détection de la PrP selon la revendication 9, caractérisé en ce que les ligands macrocycliques sont choisis parmi les métacyclophanes, de préférence parmi les calix-arènes.

11. Procédé de détection de la PrP selon la revendication 10, caractérisé en ce que le ligand macrocyclique répond à la formule générale (I) suivante :



35



dans laquelle

$R_1$  représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR, R étant tel que défini ci-dessous,

5.  $R_2$  représente un atome d'hydrogène, un groupe R, COR, Pol,  $\text{CH}_2\text{Pol}$ , dans lesquels Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, ammonium, acide carboxylique et R est tel que défini ci-dessous,

$R_3$  représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

10  $R_4$  représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR, un groupe  $\text{OCH}_2\text{R}$  ou un groupe OCOR, dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

Y est un atome de carbone, d'azote, ou un atome de soufre,

$R_5$  et  $R_6$ , chacun indépendamment, sont absents ou représentent un atome d'hydrogène, un groupement  $\text{CH}_2$  ou R tel que défini ci-dessous, ou bien

15  $R_5$  et  $R_6$  représentent ensemble un atome d'oxygène ou de soufre,

X représente un groupement  $\text{CH}_2$ , ou un atome d'oxygène ou de soufre,

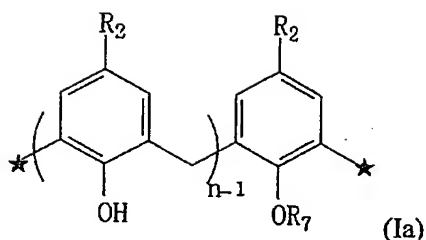
m représente un entier égal à 0 ou 1,

R représente un atome d'hydrogène ou une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

n est un entier compris entre 3 et 15,

les substituants  $R_1$  à  $R_5$ , R, X, Y et l'entier m peuvent être de nature différente suivant les motifs.

25 12. Procédé de détection de la PrP selon la revendication 11, caractérisé en ce que le ligand macrocyclique répond à la formule générale (Ia) suivante :



dans laquelle

$n$  est un entier compris entre 4 et 8,

chaque groupement  $R_2$ , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou  
 5 un groupement phosphate

$R_7$  représente un groupement  $(CH_2)_t-(CO)_s-(NH_2)$  ou un groupement  $(CH_2)_t-COOH$  où  $t$  est un entier compris entre 0 et 6 et  $s$  est un entier compris entre 0 et 6.

10 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit ligand est un calix-arène de formule (Ia) dans lequel les deux groupements  $R_2$  sont chacun un groupement sulfate,  $n$  est 4, 6 ou 8, et  $R_7$  est un atome d'hydrogène, un groupement  $-CH_2COOH$ , un groupement  $-CH_2CONH_2$  ou un groupement  $-CH_2CH_2NH_2$ .

15 14. Procédé de détection de la PrP selon la revendication 10, caractérisé en ce que le ligand macrocyclique répond à la formule générale (Ia) dans laquelle  $n=6$ ,  $X=Y=\text{sulfate}$  et  $R_7$  est  $-CH_2CH_2NH_2$ .

20 15. Procédé de détection de la PrP, en particulier de la PrP<sup>sc</sup>, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape de mise en présence d'un échantillon biologique, issu ou obtenu d'un organisme animal ou humain, avec une molécule ayant au moins deux fonctions guanidinium et/ou ammonium, à l'exception des antibiotiques.

25 16. Kit de diagnostic pour la détection de la PrP, caractérisé en ce qu'il comprend un ligand autre qu'un ligand protéique et une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique.

17. Kit de diagnostic selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit ligand autre qu'un ligand protéique est lié à un support solide.

1/6

Figure 1

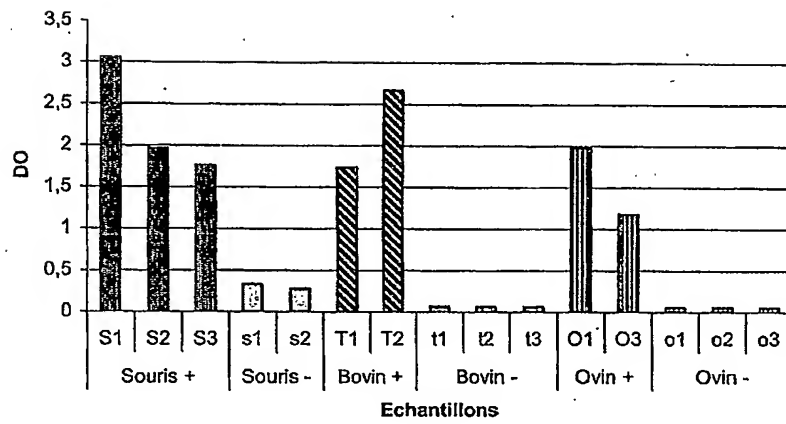
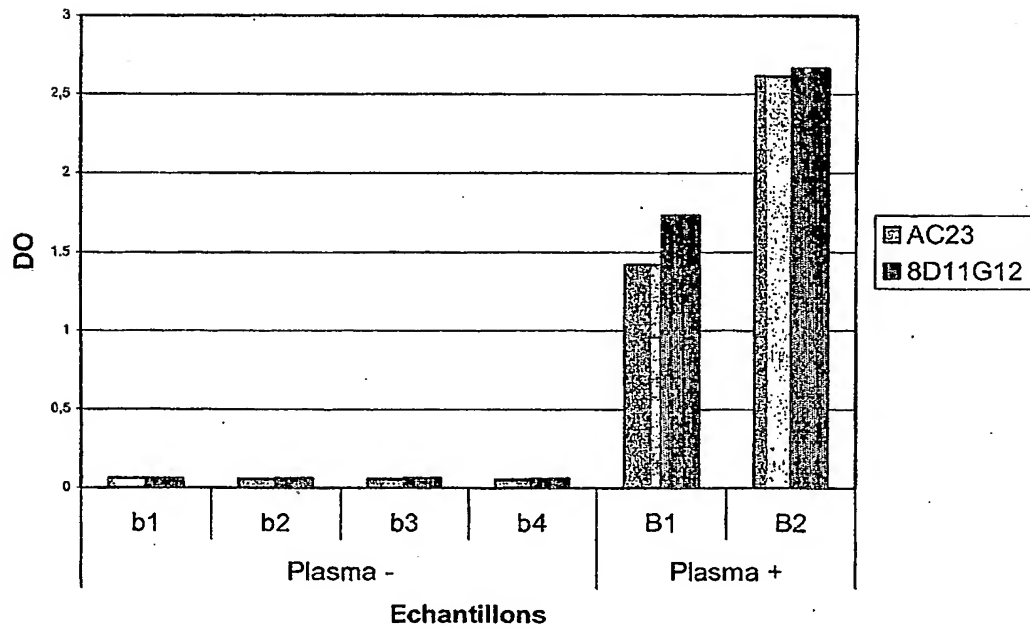
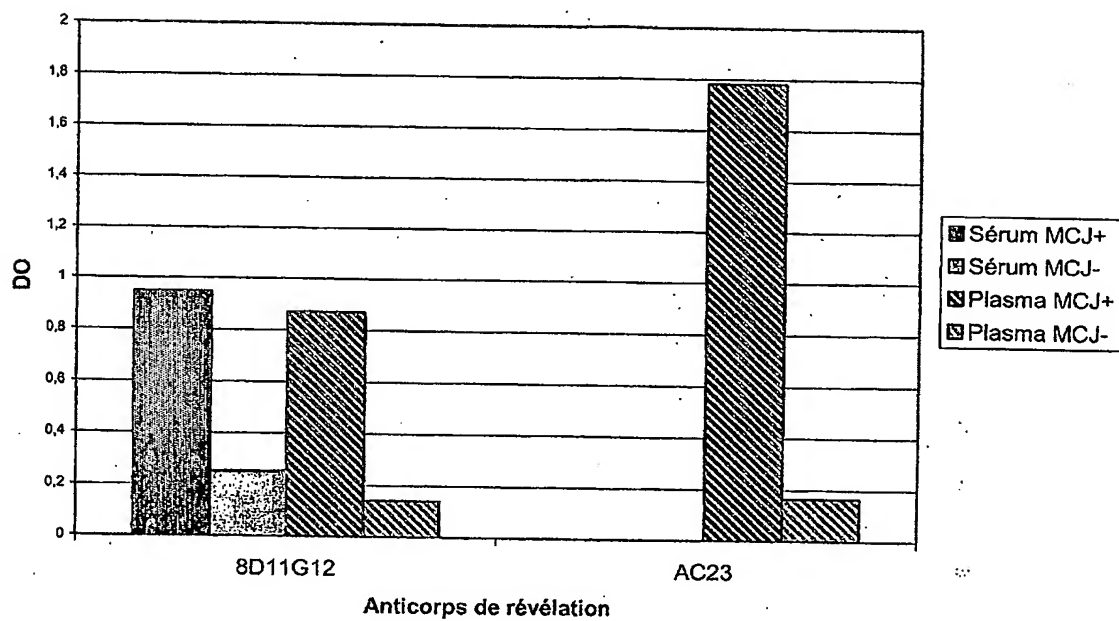


Figure 2



2/6

Figure 3



3/6

**Figure 4**

Figure 4A

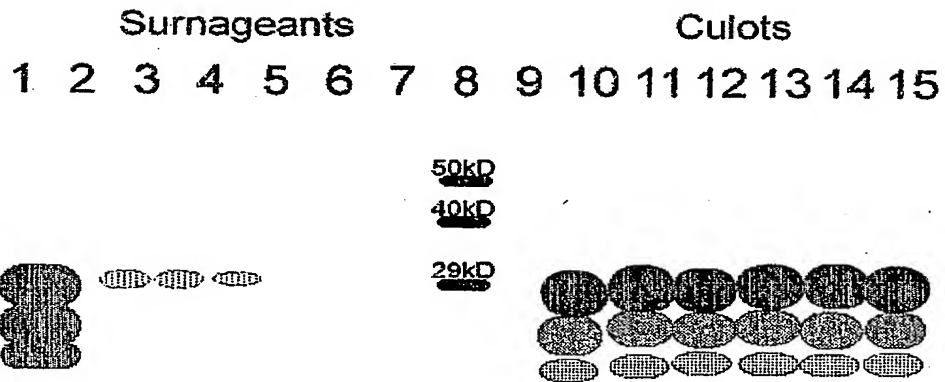
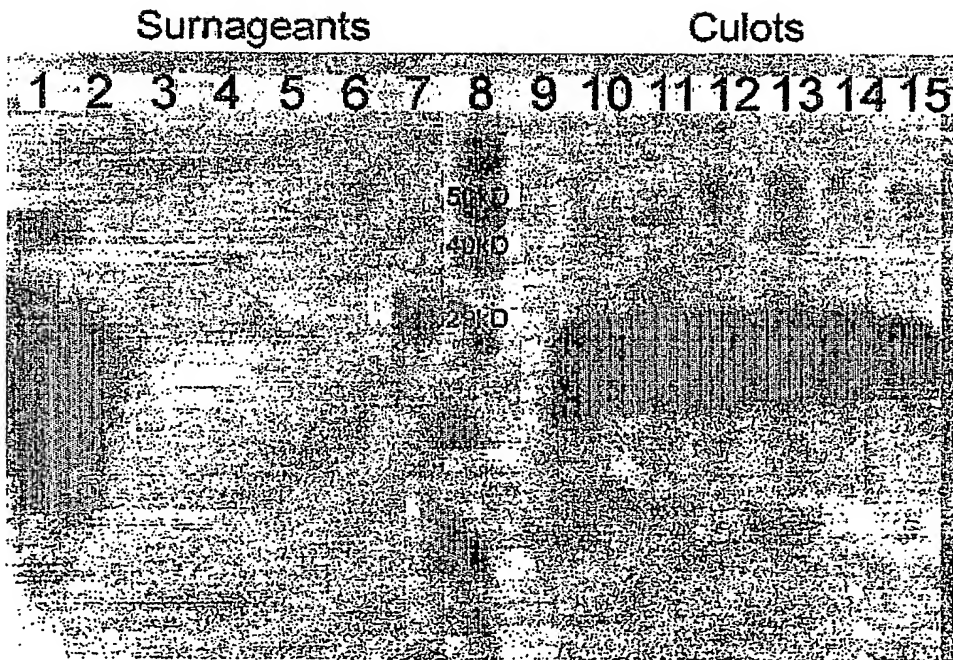


Figure 4B



4/6

**Figure 5**

Figure 5A

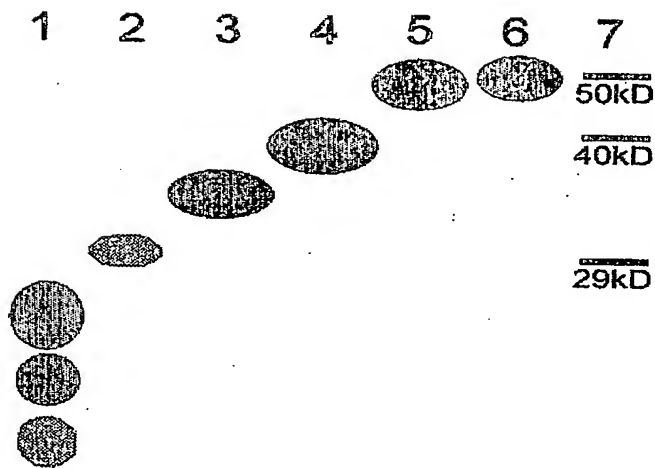
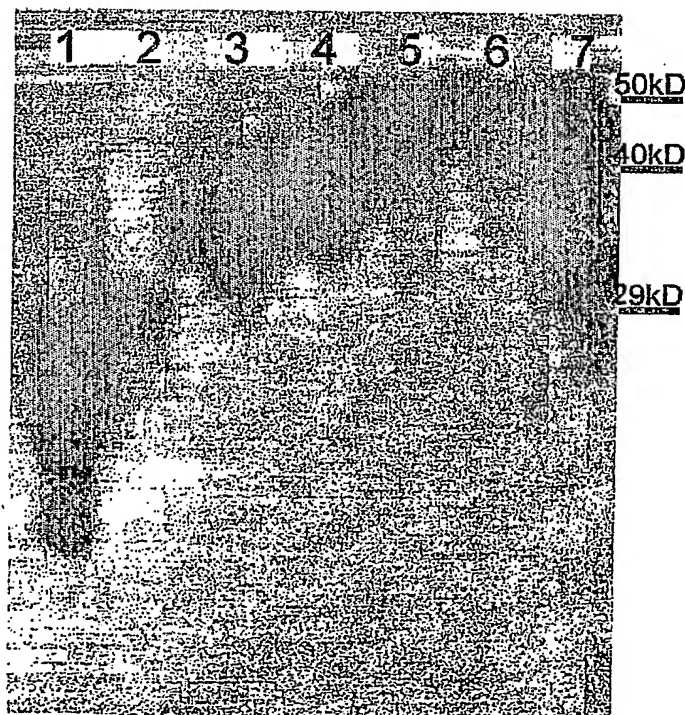


Figure 5B



**Figure 6**



6/6

Figure 7

Figure 7A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

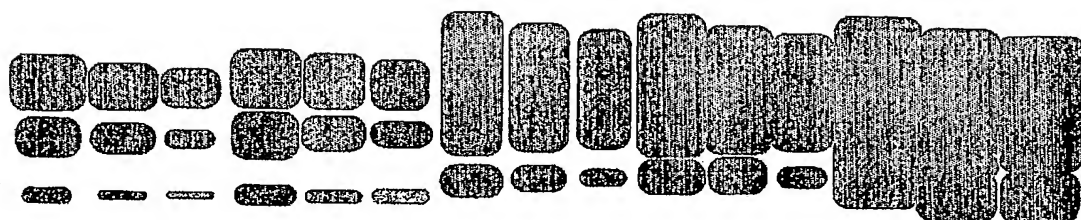
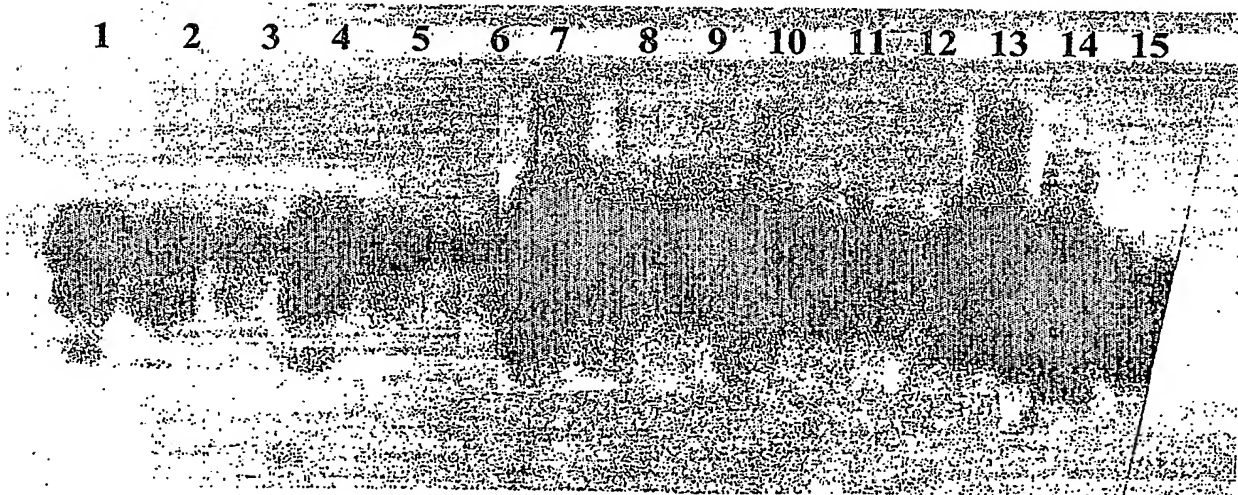


Figure 7B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



reçue le 08/07/04



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

0825 83 85 87  
0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

## BREVET D'INVENTION

### CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../3..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 © W / 210103

**INV**

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		CAPRIS PRIOINT
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0606538
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
Procédé de détection de la PrP utilisant une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et un ligand autre qu'un ligand protéique		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
- bioMérieux - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments - Centre National de la Recherche Scientifique - Université Claude Bernard Lyon		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b> Nom		BENSCIK-REYNIER
Prénoms		Anna
Adresse	Rue	1280 route du Plateau
	Code postal et ville	131811101 SAINT CLAIR DE LA TOUR
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b> Nom		COLEMAN
Prénoms		Anthony William
Adresse	Rue	55 rue de Margnolles
	Code postal et ville	1619131010 CALUIRE-ET-CUIRE
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b> Nom		DA SILVA
Prénoms		Eric
Adresse	Rue	20 rue Camile Roy
	Code postal et ville	1619101017 LYON
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		
Marcy l'Etoile, le 11 juin 2004 Valérie BITAUD PG 10872 Ingénieur Brevets 		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

reçue le 08/07/04



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

**0 825 83 85 87**  
0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

## BREVET D'INVENTION

### CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2../3..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 0 W / 210103

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		CAPRIS PRIORIT
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		04 06538
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de détection de la PrP utilisant une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et un ligand autre qu'un ligand protéique		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- bioMérieux</li><li>- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments</li><li>- Centre National de la Recherche Scientifique</li><li>- Université Claude Bernard Lyon</li></ul>		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	DUPIN
	Prénoms	Marilyne
Adresse	Rue	Chatanay
	Code postal et ville	619161710 VAUGNERAY
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Nom	LECLERE
	Prénoms	Edwige
Adresse	Rue	12 rue des Pierres Blanches
	Code postal et ville	619101011 LYON
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Nom	MARTIN
	Prénoms	Ambroise
Adresse	Rue	605C route du Bas Privas
	Code postal et ville	619131910 CHARLY
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b> Marcy l'Etoile, le 11 juin 2004 Valérie BITAUD PG 10872 Ingénieur Brevets 		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

reçue le 08/07/04



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

0 825 83 85 87  
0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

## BREVET D'INVENTION

### CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 3.. / 3..



(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CAPRIS PRIOINT
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		04 06538
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
Procédé de détection de la PrP utilisant une molécule ayant au moins une charge positive et/ou au moins une liaison osidique et un ligand autre qu'un ligand protéique		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
<ul style="list-style-type: none"><li>- bioMérieux</li><li>- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments</li><li>- Centre National de la Recherche Scientifique</li><li>- Université Claude Bernard Lyon</li></ul>		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	MOUSSA
	Prénoms	Aly
Adresse	Rue	52 chemin du Grand Revoyet
	Code postal et ville	16 191 61 01 01 OULLINS
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Nom	PERRON
	Prénoms	Hervé
Adresse	Rue	4 allée de la Guigonnère
	Code postal et ville	16 191 21 91 01 SAINT-GENIS-LES-OLLIERES
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Nom	RONZON
	Prénoms	Frédéric
Adresse	Rue	Le Vanel
	Code postal et ville	16 191 61 11 01 MONTROMANT
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
Marcy l'Etoile, le 11 juin 2004 Valérie BITAUD PG 10872 Ingénieur Brevets		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.